

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-207026

(43)Date of publication of application : 26.07.2002

(51)Int.Cl. G01N 27/447

C12M 1/00

C12N 15/09

G01N 27/327

G01N 33/53

G01N 33/566

G01N 35/08

G01N 37/00

// C12M 1/34

(21)Application number : 2001-002755

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 10.01.2001

(72)Inventor : ITO YOSHIHIRO

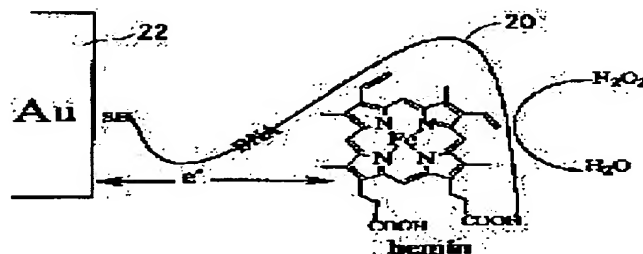
## (54) NUCLEIC ACID APTAMER SELF-INTEGRATED BIOSENSOR AND CHIP DEVICE EQUIPPED THEREWITH AS DETECTION PART

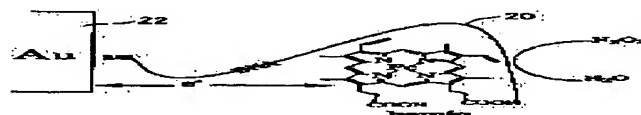
### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a biosensor requiring no mediator, excellent in stability and easy to manufacture.

**SOLUTION:** A nucleic acid aptamer 20 is formed from a complex of DNA oligonucleotide and hemin and a thiol group (SN) introduced into one end of DNA is adsorbed on a gold electrode 22 and the nucleic acid aptamer 20 is fixed to an electrode.

This nucleic acid aptamer 20 has peroxidase activity and acts as a catalyst of oxidation-reduction reaction to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.01.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The biosensor characterized by introducing the affinitive functional group with a metal into the end of nucleic-acid APUTAMA which has a catalyst function, and self-integration being carried out by the functional group in the electrode surface.

[Claim 2] It is the biosensor according to claim 1 which is the thiol group by which said nucleic-acid APUTAMA is DNA and a hemin complex, and said functional group was introduced into 5' edge of DNA.

[Claim 3] The chip device characterized by forming the biosensor according to claim 1 or 2 in said detecting element in the chip device which is equipped with the passage of the minute cross-sectional area formed in the interior of plate-like part material, and is using a part of the passage [ at least ] as the detecting element.

[Claim 4] The chip device according to claim 3 with which the sample inlet which introduces a liquid sample into said passage, and the sample exhaust port which discharges the liquid sample which passed through said passage are prepared in the plate-like part material of this chip device.

[Claim 5] This chip device is an electrophoresis chip which separates a sample by electrophoresis and is analyzed. The sample passage for intersecting the plate-like part material in the interior at the analysis passage by electrophoresis and its analysis passage, and introducing a sample into analysis passage is formed. The chip device according to claim 3 or 4 with which the hole which arrives at said analysis passage or sample passage is formed in one front face of said plate-like part material, and a part of downstream of said analysis passage serves as said detecting element.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the chip device equipped with the biosensor which can be used for the quantum of chemicals, such as a hydrogen peroxide, and such a biosensor as a detecting element.

[0002]

[Description of the Prior Art] What fixed the enzyme to the electrode is used as a biosensor which detects chemicals, such as a hydrogen peroxide. In fields, such as the field of analytical chemistry, for example, environmental analysis, clinical, and drugs, capillary electrophoresis (CE), liquid chromatography (LC), or flow injection analysis (FIA) is used as the technique of analyzing an ultralow volume component correctly and quickly. The detection meter cell which was suitable for detecting the component in the liquid sample of a minute amount as those detection meters is called for. The detection meter cell used with those analyzers is equipped with the sample exhaust port which discharges the liquid sample which passed through the sample inlet for usually introducing the liquid sample used as the candidate for analysis, the passage of a liquid sample, and its passage, has the sample room which serves as an interaction field with a liquid sample, ultraviolet, or the detection light of a visible region all over the passage, and is used, being connected with the outlet of the analysis column used for tools of analysis as shown above. Detection light is irradiated by the passage part used as the test chamber, and after detection light penetrates the liquid sample which exists in a sample room, it is detected by the measuring beam study system.

[0003] Instead of a glass capillary tube with complicated recent years and handling, it is D.J.Harrison et al./Science, Vol.261, and p.895-897 (1993) as a gestalt which can expect analytic improvement in the speed and the miniaturization of equipment. The chip device which uses two substrates for the capillary electrophoresis joined and formed is proposed as shown. The chip device is formed using the micro-machining technique based on a semi-conductor manufacturing technology in the passage for introducing a liquid sample, and the passage for separating a liquid sample on the electrophoresis member made from the glass substrate. The electrophoresis apparatus using a chip device has which advantage in which the miniaturization of ultralow volume and equipment has the possible sample with very little the possibility of high-speed analysis and solvent consumption to need as compared with conventional capillary-electrophoresis equipment. In the field of the

analytical chemistry described above, promising \*\* of the description of this is carried out from the view of high-speed analysis as a thing advantageous to screening to fields, such as DNA (deoxyribonucleic acid) analysis as that to which implementation enables difficult on-site (an on-side and bedside) analysis, by the conventional analysis apparatus.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the conventional biosensor consists of enzymes, since it is easy to carry out conversion of the enzyme, it has been the technical problem that improvement in stability is big. Moreover, in the case of the biosensor using an enzyme, since molecular weight of an enzyme is large, a direct electronic transition is difficult for it between electrode surfaces in many cases. Therefore, in order to make the mediator for an electronic transition (middle medium) live together, the reagent for it is also needed. Consequently, a complicated production process is needed in manufacture of a biosensor.

[0005] Then, the 1st purpose of this invention is that do not need a mediator, but excel also in stability and manufacture moreover also offers an easy biosensor. The 2nd purpose of this invention is offering the analyzer cel and chip device of the microanalysis equipment equipped with such a biosensor as a detecting element.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The affinitive functional group with a metal is introduced into the end of nucleic-acid APUTAMA which has a catalyst function, and self-integration of the biosensor of this invention is carried out by the functional group in the electrode surface. Nucleic-acid APUTAMA is equipped with high thermal resistance, acid resistance, and alkali resistance compared with the enzyme. Moreover, since nucleic-acid APUTAMA has low molecular weight and an electrode surface can be approached spatially, even when he has no mediator, it has high sensibility. By introducing the functional group which has compatibility with a metal in the end of nucleic-acid APUTAMA, immobilization becomes possible easily also in an electrode surface. The chip device of this invention equips a detecting element with this biosensor.

[0007]

[Embodiment of the Invention] Examples of nucleic-acid APUTAMA are DNA and a hemin complex, and a functional group is a thiol group introduced into 5' edge of DNA. It is known that DNA and a hemin complex have the catalytic activity over an oxidation reduction reaction (for example, Chemistry & Biology, 1998, Vol.5, No.9, 505 -517 reference). However, nucleic-acid APUTAMA, such as DNA and a hemin complex, is not fixed to an electrode, or using the fixed nucleic-acid APUTAMA for the detecting element of an analyzer further is not known. The thiol-ized nucleic acid is easily fixable on a metal-electrode front face.

[0008] The example which used the complex of DNA and hemin for drawing 1 as an example of nucleic-acid APUTAMA is shown. This nucleic-acid APUTAMA 20 is formed from the complex of a DNA oligonucleotide and hemin, and when the thiol group (SH) introduced into the end of DNA sticks to the golden electrode 22, nucleic-acid APUTAMA is being fixed to the electrode 22. Since the molecular weight of a DNA oligonucleotide is low, hemin is being fixed to the location spatially approached to the golden electrode 22. This nucleic-acid APUTAMA 20 has peroxidase activity, and acts as a catalyst of the oxidation reduction reaction to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

[0009] The process which carries out self-integration (immobilization) of this nucleic-acid

APUTAMA 20 to the golden electrode 22 is shown in drawing 2. The base sequence of the DNA oligonucleotide to be used is SH-PS2.M as shown in the upper part of drawing 4, or SH-20mer-1. Which DNA is adjusted so that it may become the concentration of 1mM, and it heats for 5 minutes at 95 degrees C (step S1).

[0010] The solution is diluted with buffer liquid to 1microM (step S2). As buffer liquid, they are KCl of HEPES (PH8.0) of 25mM(s), and 20mM, and 0.05% of mixed solution of TritonX-100. The diluted solution is left for 30 minutes at a room temperature (step S3). Then, in addition (step S4), an incubation is performed in the DNA solution for 20 minutes so that it may become the concentration of 10microM about hemin (step S5). An incubation is performed permeating at 37 degrees C.

[0011] Then, after 1microl Carrying the solution on a golden electrode (step S6) and leaving it for 1 hour, it washes with ion exchange water (step S7). By the above actuation, as shown in drawing 1, the biosensor with which nucleic-acid APUTAMA 20 was fixed by the golden electrode 22 is obtained.

[0012] Next, the example which measured the oxidation reduction reaction of H2O2 is explained using this biosensor. It prepares so that H2O2 may be diluted with a phosphoric-acid buffer and KCl as a sample and it may be set to 600microM. The biosensor created as mentioned above was dipped in the sample solution, and valve flow coefficient (cyclic Volta NOMETORI) measurement was performed. By valve flow coefficient measurement, the electrical potential difference was reduced toward 0V to -1.0V, and the scan speed was carried out in 0.1v/second in the cycle again returned to 0V.

[0013] The result is shown in drawing 3. \*\* It is as a result of [ by DNA and the hemin complex of this invention shown above ] valve flow coefficient measurement, and is as a result of [ when \*\* adds only hemin to the sample solution to it ] measurement. Only in the case of hemin, hemin is not being fixed to the electrode. The location of a reduction peak has shifted from the result of drawing 3 in the measurement result of only hemin, and the measurement result of DNA and a hemin complex. By using hemin as DNA and a complex and fixing DNA on a golden electrode from this, the condition on a golden electrode changes and it is thought that the location of a reduction peak shifted under the effect.

[0014] Next, the result of having investigated the responsibility over H2O2 in the example which fixed DNA and a hemin complex to the golden electrode is indicated to be drawing 4 (A) to (B). In SH-PS2.M which the DNA oligonucleotide showed to the array number 1 of an array table, (A) is the case of SH-20mer-1 the DNA oligonucleotide indicated (B) to be to the array number 2 of an array table. As indicated above, after fixing DNA and a hemin complex to a golden electrode, the result of having performed valve flow coefficient measurement by the sample of H2O2 of each concentration diluted with the buffer is shown. The concentration of the 2OH2 sample solution was 60, 600, and 6000microM. The result of drawing 4 (A) and (B) shows that a response characteristic changes with classes of DNA. Moreover, since drawing 4 (A) and the same response characteristic as (B) were shown even after heating for 30 minutes at 100 degrees C, it turns out that nucleic-acid APUTAMA is equipped with high thermal resistance.

[0015]

[Example] Drawing 5 expresses one example which applied this invention to the chip device, (a) is the plan and (b) is a sectional view in the A-A line position. This chip device is equipped with the passage 8 of the minute cross section formed in the interior of plate-like part material, a part of that passage [ at least ] 8 is used as the detecting element, and the

biosensor of this invention is formed in that detecting element.

[0016] If shown concretely, the glass substrates 1 and 2 which become with a quartz are stuck, and the minute passage slot 8 with the width of face and the depth of several 100 micrometers or less for [ for liquid samples ] passage is formed in the glass substrate 1 side of the stuck field. Sample inlet 9a penetrates a glass substrate 2, and is prepared in the end of the passage slot 8, and sample exhaust port 9b penetrates a glass substrate 2 to the other end of the passage slot 8, and is prepared in it.

[0017] The golden electrode 10 is formed in the sample exhaust port side of the passage slot 8, and the lead part 12 connected with the golden electrode 10 is extended to the side edge side of a substrate 1. At the edge of the lead part 12, it can stab and a crevice 14 is formed, and the edge of the lead part 12 can be exposed to the crevice 14, and can connect some substrates 2 now with a measuring circuit. By carrying out the mask vacuum evaporation of the gold, the golden electrode 10 and the lead part 12 are formed in the thickness of 50–300nm. In the golden electrode 10, affinitive functional groups with a metal, such as a thiol group introduced into the end, are fixed, and nucleic-acid APUTAMA which has catalyst functions, such as DNA and a hemin complex, constitutes the biosensor. The biosensor serves as a detecting element. both the substrates 1 and 2 oppose the field which should be joined, and are stuck -- making -- adhesives -- or it is junction by the fluoric acid solution, and the passage slot 8 is formed by joining airtightly.

[0018] Drawing 6 shows the example which applied this invention to the chip device of an electrophoresis apparatus. (a) is a front view in the condition of the top view of one substrate 31 and (b) having combined the top view of the substrate of another side, and (c) having combined both the substrates 31 and 32, and having considered as the chip device. This chip device is an electrophoresis chip which separates a sample by electrophoresis and is analyzed. The sample passage 34 for intersecting the plate-like part material in the interior at the analysis passage 35 and the analysis passage 35 by electrophoresis, and introducing a sample into the analysis passage 35 is formed. The hole 33 which arrives at the analysis passage 35 or the sample passage 34 is formed in one front face of this plate-like part material, a part of downstream of the analysis passage 35 serves as a detecting element, and the biosensor of this invention is formed in that detecting element.

[0019] If shown concretely, this chip device consists of transparency glass substrates 31 and 32 of a pair, the sample passage 34 and the analysis passage 35 which intersect the front face of one substrate 32 mutually are formed, the golden electrode 37 is formed in the downstream of the analysis passage 35 like the example of drawing 5, and the lead part 38 connected with the golden electrode 37 is extended to the side edge side of a substrate 32. By carrying out the mask vacuum evaporation of the gold, the golden electrode 37 and the lead part 38 are formed in the thickness of 50–300nm. Nucleic-acid APUTAMA which has catalyst functions, such as DNA and a hemin complex, is fixed to the golden electrode 37 as well as the example of drawing 5 by affinitive functional groups with a metal, such as a thiol group introduced into the end, and the biosensor is constituted. The biosensor serves as a detecting element.

[0020] The reservoir 33 is formed by the substrate 31 of another side as a through hole in the location corresponding to the both ends of the sample passage 34 and the analysis passage 35. Moreover, in the location applicable to the edge of the lead part 38, when it can stab at some substrates 31, a crevice 40 is formed and both the substrates 31 and 32 are combined, the edge of the lead part 38 can be exposed from the crevice 40, and can

connect with a measuring circuit.

[0021] As both the substrates 31 and 32 are shown in (c), it is stretched in piles and the chip device is formed so that passage 34 and 35, an electrode 37, and the lead part 38 may come inside. both the substrates 31 and 32 oppose the field which should be joined, and are stuck -- making -- adhesives -- or it is junction by the fluoric acid solution, and is joined airtightly.

[0022] When using this chip device, a migration buffer or a gel solution is poured in all over the sample passage 34 and the analysis passage 35 as a migration medium from one of the reservoirs 33. Then, after pouring a sample into the reservoir 33 of one edge of the sample passage 34, using the electrode which inserted the electrode in each reservoir 33, respectively, or was beforehand formed in each reservoir 33, only predetermined time impresses the predetermined high voltage to the both ends of the sample passage 34, and this leads a sample to the intersection 6 of the sample passage 34 and the analysis passage 35. Next, the predetermined electrical potential difference for migration is impressed to the both ends of the analysis passage 35, and the sample which exists in an intersection 36 is made to draw and separate in the analysis passage 35. The biosensor as a detecting element formed in the location of the downstream of the analysis passage 35 detects a separation component.

[0023]

[Effect of the Invention] Since it introduces the functional group which has compatibility with a metal in the end of nucleic-acid APUTAMA which has a catalyst function and carries out self-integration by the functional group in an electrode surface, the biosensor of this invention is easy to manufacture, can attain high thermal resistance, acid resistance, and alkali resistance compared with an enzyme, and even if he has no mediator, it can detect them by high sensibility. The chip device of this invention which equipped the detecting element with this biosensor can take out a detecting signal direct picking as an electrical signal.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

**[Drawing 1]** It is drawing showing this invention roughly as an example of nucleic-acid APUTAMA using the complex of DNA and hemin.

**[Drawing 2]** It is the flow chart Fig. showing the process which carries out self-integration of nucleic-acid APUTAMA at the golden electrode 22.

**[Drawing 3]** It is drawing showing valve flow coefficient measurement result by DNA and the hemin complex, and the measurement result only by hemin.

**[Drawing 4]** It is drawing showing the result of having investigated the responsibility over H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in an example, and, in SH-PS2.M which the DNA oligonucleotide showed to the array number 1 of an array table, (A) is the case of SH-20mer-1 the DNA oligonucleotide indicated (B) to be to the array number 2 of an array table.

**[Drawing 5]** It is drawing showing one example which applied this invention to the chip device, and (a) is the plan and (b) is a sectional view in the A-A line position.

**[Drawing 6]** It is drawing showing the example which applied this invention to the chip device of an electrophoresis apparatus, and (a) is a front view in the condition of the top view of one substrate and (b) having combined the top view of the substrate of another side, and (c) having combined both substrates, and having considered as the chip device.

**[Description of Notations]**

1, 2, 31, 32 Glass substrate

8 Passage Slot

9a Sample inlet

9b Sample exhaust port

10, 22, 37 Golden electrode

20 Nucleic-Acid APUTAMA

34 Sample Passage

35 Analysis Passage

**[Layout Table]** \*\*110\*\* Shimadzu Corporation

\*\*120\*\* a biosensor provided with nucleic acid aptamer and a chip device having same as a detection part

\*\*130\*\* K1000783

\*\*160\*\* 2

\*\*210\*\* 1

\*\*211\*\* 18

**\*\*212\*\* DNA**

**\*\*213\*\* Artificial Sequence**

**\*\*220\*\* unsure**

**\*\*400\*\* 1**

gtg ggt agg gcg ggt tgg

**\*\*210\*\* 2**

**\*\*211\*\* 20**

**\*\*212\*\* DNA**

**\*\*213\*\* Artificial Sequence**

**\*\*220\*\* unsure**

**\*\*400\*\* 2**

gcg tgg gtg ggt ggg tgg gt

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-207026

(P2002-207026A)

(43) 公開日 平成14年7月26日 (2002.7.26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 27/447		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 8
C 1 2 M 1/00		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	33/566	4 B 0 2 9
G 0 1 N 27/327		35/08	D
33/53		37/00	1 0 1
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-2755(P2001-2755)

(22) 出願日 平成13年1月10日 (2001.1.10)

(71) 出願人 000001993

株式会社島津製作所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72) 発明者 伊藤 嘉浩

徳島県徳島市南常三島町2-1

(74) 代理人 100085464

弁理士 野口 繁雄

Fターム(参考) 2G058 AA09 DA07 GA12

4B024 AA11 CA09 HA12

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03

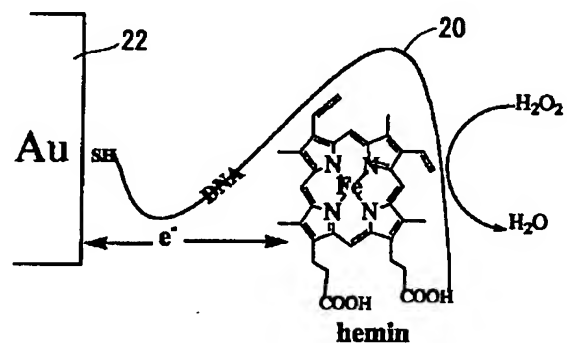
FA12

(54) 【発明の名称】 核酸アプタマー自己集積化バイオセンサー及びそれを検出部として備えたチップデバイス

(57) 【要約】

【課題】 メディエーターを必要とせず、安定性にもすぐれて、しかも製作も容易なバイオセンサーを提供する。

【解決手段】 核酸アプタマー20はDNAオリゴヌクレオチドとヘミンとの錯体から形成されており、DNAの一端に導入されたチオール基 (SH) が金電極22に吸着することにより、核酸アプタマーが電極22に固定されている。この核酸アプタマー20はペルオキシダーゼ活性をもち、 $H_2O_2$ に対する酸化還元反応の触媒として作用する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 触媒機能を有する核酸アプタマーの一端に金属との親和性のある官能基が導入されており、その官能基により電極表面に自己集積化されていることを特徴とするバイオセンサー。

【請求項2】 前記核酸アプタマーはDNA・ヘミン錯体であり、前記官能基はDNAの5'端に導入されたチオール基である請求項1に記載のバイオセンサー。

【請求項3】 板状部材の内部に形成された微小断面積の流路を備え、その流路の少なくとも一部を検出部としているチップデバイスにおいて、前記検出部には請求項1又は2に記載のバイオセンサーが設けられていることを特徴とするチップデバイス。

【請求項4】 このチップデバイスの板状部材には、前記流路に液体試料を導入する試料導入口と、前記流路を通過した液体試料を排出する試料排出口が設けられている請求項3に記載のチップデバイス。

【請求項5】 このチップデバイスは電気泳動により試料を分離し分析する電気泳動チップであり、その板状部材にはその内部に電気泳動による分析流路とその分析流路に交差して分析流路に試料を導入するためのサンプル流路が形成され、前記板状部材の一表面には前記分析流路又はサンプル流路に達する穴が形成されており、前記分析流路の下流側の一部が前記検出部となっている請求項3又は4に記載のチップデバイス。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、過酸化水素などの化学物質の定量に用いることのできるバイオセンサーと、そのようなバイオセンサーを検出部として備えたチップデバイスに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】過酸化水素などの化学物質を検出するバイオセンサーとしては、酵素を電極に固定したものが使用されている。分析化学の分野、例えば環境分析、臨床、医薬品などの分野において、極微量成分を正確に、かつ迅速に分析する手法として、キャピラリー電気泳動(CE)、液体クロマトグラフィー(LC)又はフローインジェクション分析(FIA)等が用いられている。それらの検出計として、微量の液体試料中の成分を検出するのに適した検出計セルが求められている。それらの分析計で用いられる検出計セルは、通常、分析対象となる液体試料を導入するための試料導入口、液体試料の流路及びその流路を通過した液体試料を排出する試料排出口を備え、その流路中に液体試料と紫外あるいは可視領域の検出光との相互作用領域となる試料室を有し、上に示したような分析手法に用いられる分析カラムの出口に接続されて使用される。その測定室となる流路部分には検出光が照射され、検出光は試料室に存在する液体試料を透過した後、測定光学系により検出される。

【0003】近年、取扱いが煩雑なガラスキャピラリーに代わって、分析の高速化、装置の小型化が期待できる形態として、D. J. Harrison et al./ Science, Vol. 261, p. 895-897 (1993) に示されているように、2枚の基板を接合して形成されたキャピラリー電気泳動に用いるチップデバイスが提案されている。そのチップデバイスは、ガラス基板を材料とした電気泳動部材上に液体試料を導入するための流路と、液体試料を分離するための流路を半導体製造技術を基盤とするマイクロマシニング技術を用いて形成されたものである。チップデバイスを用いた電気泳動装置は、従来のキャピラリー電気泳動装置と比較して、高速分析が可能、溶媒消費量が極めて少ない、必要とするサンプルが極微量、装置の小型化が可能などの利点を有する。これの特徴は、上に述べた分析化学の分野において、従来の分析装置では実現が困難であった現場(オンサイドやベッドサイド)分析を可能とするものとして、またDNA(デオキシリボ核酸)分析などの分野に対しては、高速分析の視点からスクリーニングに有利なものとして有望視されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来のバイオセンサーは酵素で構成されているが、酵素は変成しやすいため、安定性の向上が大きな課題となっている。また、酵素を用いたバイオセンサーの場合、酵素は分子量が大きいため、電極表面との間で直接的な電子移動が困難な場合が多い。そのため、電子移動のためのメディエーター(中間媒体)を共存させる必要があるため、そのための試薬も必要になる。その結果、バイオセンサーの製作にあたって、複雑な製造工程が必要となる。

【0005】そこで、本発明の第1の目的は、メディエーターを必要とせず、安定性にもすぐれて、しかも製作も容易なバイオセンサーを提供することである。本発明の第2の目的は、そのようなバイオセンサーを検出部として備えた、微量分析装置の分析計セルやチップデバイスを提供することである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明のバイオセンサーは、触媒機能を有する核酸アプタマーの一端に金属との親和性のある官能基が導入されており、その官能基により電極表面に自己集積化されているものである。核酸アプタマーは、酵素に比べて高い耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性を備えている。また、核酸アプタマーは分子量が低いため、空間的に電極表面に近づくことができるので、メディエーターなしでも高い感度を有する。核酸アプタマーの一端に金属との親和性のある官能基を導入することにより、電極表面にも容易に固定化が可能になる。本発明のチップデバイスは、検出部にこのバイオセンサーを備えたものである。

## 【0007】

【発明の実施の形態】核酸アプタマーの一例は、DNA

・ヘミン錯体であり、官能基はDNAの5'端に導入されたチオール基である。DNA・ヘミン錯体が酸化還元反応に対する触媒活性をもつことは知られている（例えば、Chemistry & Biology, 1998, Vol. 5, No. 9, 505-517参照）。しかし、DNA・ヘミン錯体などの核酸アプタマーを電極に固定したり、さらにその固定された核酸アプタマーを分析計の検出部に用いることは知られていない。チオール化した核酸は金属電極表面に容易に固定化できる。

【0008】図1に核酸アプタマーの一例としてDNAとヘミンとの錯体を使用した例を示す。この核酸アプタマー20はDNAオリゴヌクレオチドとヘミンとの錯体から形成されており、DNAの一端に導入されたチオール基（SH）が金電極22に吸着することにより、核酸アプタマーが電極22に固定されている。DNAオリゴヌクレオチドの分子量は低いため、ヘミンは金電極22に対し空間的に接近した位置に固定されている。この核酸アプタマー20はペルオキシダーゼ活性をもっており、 $H_2O_2$ に対する酸化還元反応の触媒として作用する。

【0009】この核酸アプタマー20を金電極22に自己集積化（固定）する工程を図2に示す。使用するDNAオリゴヌクレオチドの塩基配列は、図4の上部に示されるようなSH-PS2. M又はSH-20mer-1である。何れかのDNAを1mMの濃度になるように調整して、95℃で5分間加熱する（ステップS1）。

【0010】その溶液をバッファ液で1μMに希釈する（ステップS2）。バッファ液としては25mMのHEPES（pH8.0）、20mMのKCl及び0.05%のTriton X-100の混合溶液である。その希釈された溶液を室温で30分間放置する（ステップS3）。その後、そのDNA溶液に、ヘミンを10μMの濃度になるように加え（ステップS4）、20分間インキュベーションを行なう（ステップS5）。インキュベーションは37℃で浸透しながら行なう。

【0011】その後、その溶液を金電極の上に1μl載せ（ステップS6）、1時間放置した後、イオン交換水で洗う（ステップS7）。以上の操作により、図1に示されたように、核酸アプタマー20が金電極22に固定化されたバイオセンサーが得られる。

【0012】次に、このバイオセンサーを用いて、 $H_2O_2$ の酸化還元反応を測定した例を説明する。試料として $H_2O_2$ をリン酸バッファとKClで希釈して600μMとなるように調製する。その試料溶液に、上のよう作成したバイオセンサーを浸し、CV（サイクリックボルタノメトリ）測定を行った。CV測定では、0Vから-1.0Vに向かって電圧を低下させ、再び0Vへ戻すサイクルで、その走査速度を0.1V/秒とした。

【0013】その結果を図3に示す。①は上に示した本発明のDNA・ヘミン錯体によるCV測定結果であり、

それに対し、②は試料溶液にヘミンのみを加えた場合の測定結果である。ヘミンのみの場合はヘミンは電極に固定されていない。図3の結果から、ヘミンのみの測定結果とDNA・ヘミン錯体の測定結果とでは、還元ピークの位置がずれている。このことから、ヘミンをDNAと錯体とし、DNAを金電極上に固定することにより、金電極上での状態が変化し、その影響で還元ピークの位置がずれたものと考えられる。

【0014】次に、DNA・ヘミン錯体を金電極に固定した実施例における $H_2O_2$ に対する応答性を調べた結果を図4（A）と（B）に示す。（A）はDNAオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号1に示したSH-PS2. Mの場合、（B）はDNAオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号2に示したSH-20mer-1の場合である。上に記載したように金電極へDNA・ヘミン錯体を固定した後、バッファで希釈した各濃度の $H_2O_2$ の試料でCV測定を行なった結果を示している。 $H_2O_2$ 試料溶液の濃度は60、600、6000μMであった。図4（A）と（B）の結果から、DNAの種類により応答特性が異なることがわかる。また、100℃で30分間加熱した後も図4（A）と（B）と同じ応答特性を示したことから、核酸アプタマーは高い耐熱性を備えていることがわかる。

【0015】

【実施例】図5は本発明をチップデバイスに適用した一実施例を表わしたものであり、（a）はその上面図、

（b）はそのA-A線位置での断面図である。このチップデバイスは、板状部材の内部に形成された微小断面積の流路8を備え、その流路8の少なくとも一部を検出部としており、その検出部には本発明のバイオセンサーが設けられている。

【0016】具体的に示すと、石英にてなるガラス基板1、2が貼り合わされ、その貼り合わされた面のガラス基板1側には数100μm以下の幅と深さをもつ液体試料用流路用の微小な流路溝8が形成されている。流路溝8の一端には試料導入口9aがガラス基板2を貫通して設けられ、流路溝8の他端には試料排出口9bがガラス基板2を貫通して設けられている。

【0017】流路溝8の試料排出口側には、金電極10が形成されており、金電極10につながるリード部分12が基板1の側端面まで伸びている。リード部分12の端部では、基板2の一部が切りかかれて凹部14が形成され、リード部分12の端部がその凹部14に露出して測定回路と接続できるようになっている。金電極10及びリード部分12は金をマスク蒸着することにより、50～300nmの厚さに形成されている。その金電極10には、DNA・ヘミン錯体などの触媒機能を有する核酸アプタマーが、その一端に導入されたチオール基など金属との親和性のある官能基によって固定されてバイオセンサーを構成している。そのバイオセンサーが検出部

となっている。両基板1, 2は、接合すべき面を向かい合わせて密着させ、接着剤により、又はフッ酸溶液による接合で、気密に接合することにより流路溝8を形成している。

【0018】図6は本発明を電気泳動装置のチップデバイスに適用した実施例を示したものである。(a)は一方の基板31の平面図、(b)は他方の基板の平面図、(c)は両基板31, 32を組み合わせてチップデバイスとした状態の正面図である。このチップデバイスは電気泳動により試料を分離し分析する電気泳動チップであり、その板状部材にはその内部に電気泳動による分析流路35と分析流路35に交差して分析流路35に試料を導入するためのサンプル流路34が形成され、この板状部材の一表面には分析流路35又はサンプル流路34に達する穴33が形成されており、分析流路35の下流側の一部が検出部となっており、その検出部には本発明のバイオセンサーが設けられている。

【0019】具体的に示すと、このチップデバイスは一方の透明ガラス基板31, 32からなり、一方の基板32の表面に互いに交差するサンプル流路34と分析流路35が形成され、分析流路35の下流側には図5の実施例と同様に、金電極37が形成されており、金電極37につながるリード部分38が基板32の側端面まで伸びている。金電極37及びリード部分38は金をマスク蒸着することにより、50～300nmの厚さに形成されている。その金電極37にも、図5の実施例と同様に、DNA・ヘミン錯体などの触媒機能を有する核酸アプタマーが、その一端に導入されたチオール基など金属との親和性のある官能基によって固定されてバイオセンサーを構成している。そのバイオセンサーが検出部となっている。

【0020】他方の基板31にはサンプル流路34及び分析流路35の両端に対応する位置にリザーバ33を貫通穴として設けられている。また、リード部分38の端部に該当する位置では、基板31の一部が切りかかれて凹部40が形成され、両基板31, 32を組み合わせたとき、リード部分38の端部がその凹部40から露出して測定回路と接続できるようにする。

【0021】両基板31, 32は、(c)に示すように、流路34, 35、電極37及びリード部分38が内側にくるように重ねて張り合わされて、チップデバイスが形成されている。両基板31, 32は、接合すべき面を向かい合わせて密着させ、接着剤により、又はフッ酸溶液による接合で、気密に接合されている。

【0022】このチップデバイスを使用するときは、いずれかのリザーバ33から泳動媒体として泳動バッファ又はゲル溶液をサンプル流路34及び分析流路35中に注入する。その後、サンプル流路34の一方の端のリザーバ33にサンプルを注入した後、各リザーバ33にそれぞれ電極を差し込むか、又は予め各リザーバ33に形

成された電極を用いて、サンプル流路34の両端に所定時間だけ所定の高電圧を印加し、これによりサンプルをサンプル流路34と分析流路35の交差部6に導く。次に、分析流路35の両端に泳動のための所定の電圧を印加し、交差部6に存在するサンプルを分析流路35内に導き、分離させる。分析流路35の下流側の位置に形成された検出部としてのバイオセンサーにより、分離成分の検出を行なう。

#### 【0023】

【発明の効果】本発明のバイオセンサーは、触媒機能を有する核酸アプタマーの一端に金属との親和性のある官能基を導入し、その官能基により電極表面に自己集積化したものである。製作が容易で、酵素に比べて高い耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性を達成することができ、メディエーターなしでも高い感度で検出することができる。検出部にこのバイオセンサーを備えた本発明のチップデバイスは検出信号を電気信号として直接取り出すことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】核酸アプタマーの一例としてDNAとヘミンとの錯体を使用して本発明を概略的に示す図である。

【図2】核酸アプタマーを金電極22に自己集積化する工程を示すフローチャート図である。

【図3】DNA・ヘミン錯体によるCV測定結果とヘミンのみによる測定結果を示す図である。

【図4】実施例におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対する応答性を調べた結果を示す図で、(A)はDNAオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号1に示したSH-PS2. Mの場合、(B)はDNAオリゴヌクレオチドが配列表の配列番号2に示したSH-20mer-1の場合である。

【図5】本発明をチップデバイスに適用した一実施例を示す図で、(a)はその上面図、(b)はそのA-A線位置での断面図である。

【図6】本発明を電気泳動装置のチップデバイスに適用した実施例を示す図で、(a)は一方の基板の平面図、(b)は他方の基板の平面図、(c)は両基板を組み合わせてチップデバイスとした状態の正面図である。

#### 【符号の説明】

1, 2, 31, 32	ガラス基板
8	流路溝
9a	試料導入口
9b	試料排出口
10, 22, 37	金電極
20	核酸アプタマー
34	サンプル流路
35	分析流路

【配列表】〈110〉Shimadzu Corporation

〈120〉a biosensor provided with nucleic acid aptamer and a chip device having same as a detection part

&lt;130&gt; K1000783

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; unsure

&lt;400&gt; 1

gtg ggt agg gcg ggt tgg

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

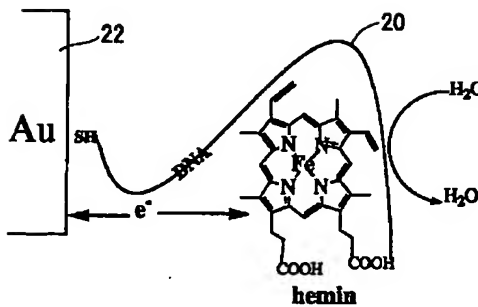
&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; unsure

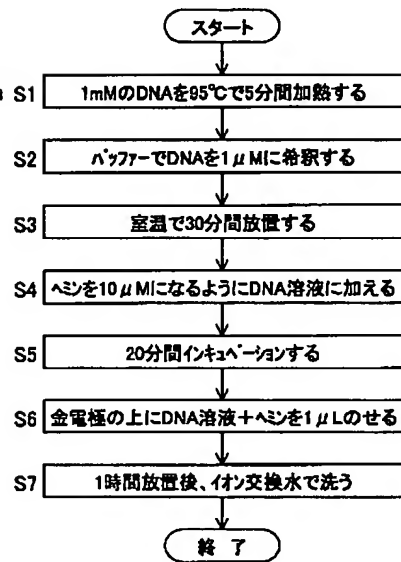
&lt;400&gt; 2

gcg tgg gtg ggt ggg tgg gt

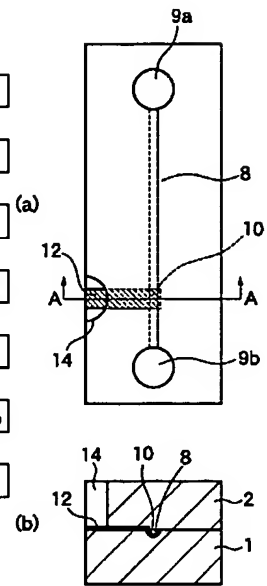
【図1】



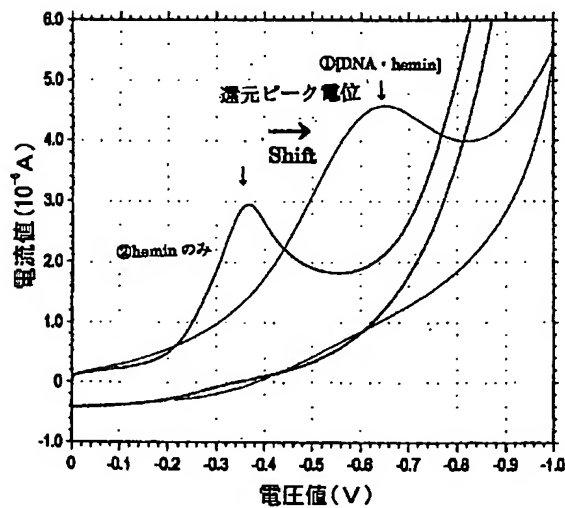
【図2】



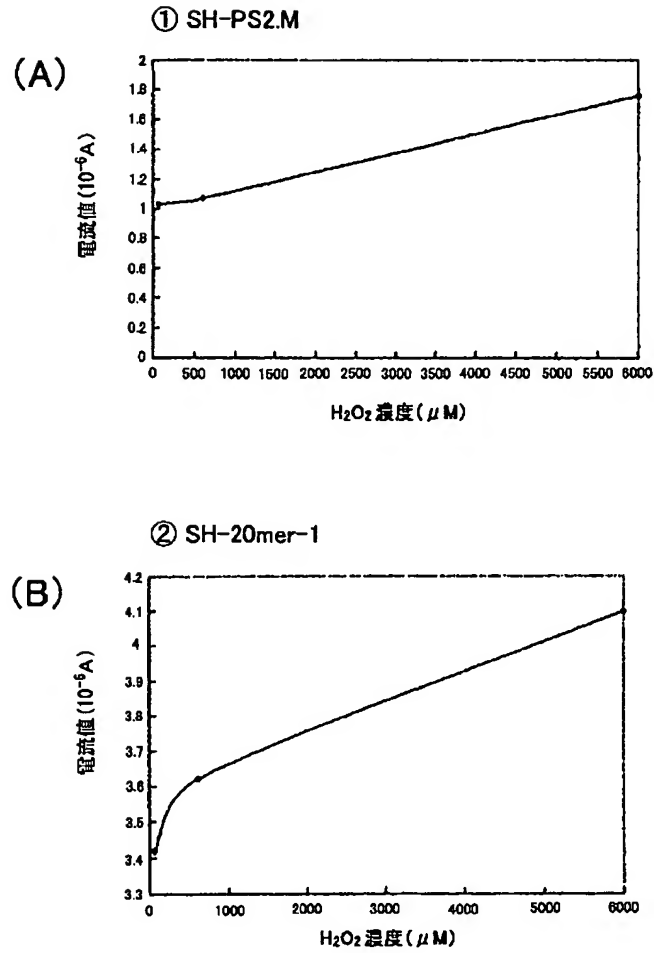
【図5】



【図3】

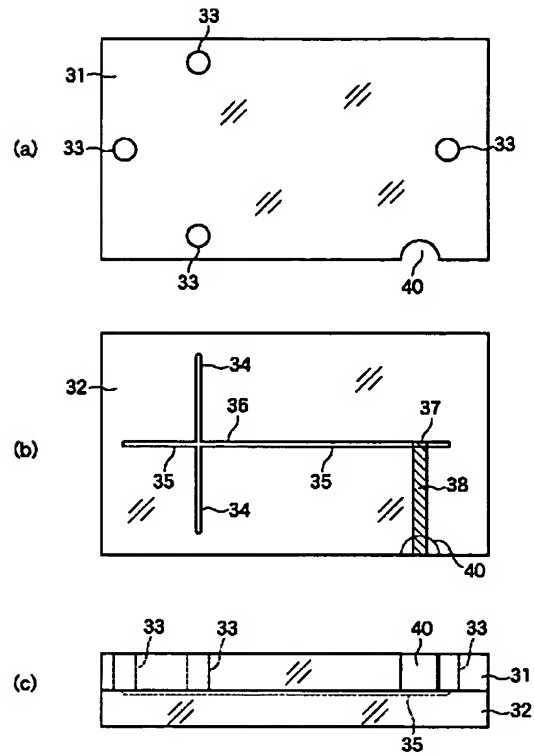


【図4】





【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7  
G 0 1 N 33/566  
35/08  
37/00  
// C 1 2 M 1/34

識別記号  
1 0 1

F I  
C 1 2 M 1/34  
G 0 1 N 27/26  
C 1 2 N 15/00  
G 0 1 N 27/26  
27/30

テームコード (参考)

Z  
3 3 1 J  
Z N A A  
3 1 1 E  
3 5 3 J